

Coagulation testing in atherosclerosis and liver disease

Citation for published version (APA):

Kleinegris, MC. F. (2016). *Coagulation testing in atherosclerosis and liver disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20161012mk>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20161012mk](https://doi.org/10.26481/dis.20161012mk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

In **hoofdstuk 1** wordt het onderwerp van dit proefschrift geïntroduceerd. Hemostase, in de volksmond ook wel de bloedstolling genoemd, is in het menselijk lichaam het mechanisme dat moet voorkomen dat er bloedverlies optreedt. Het is het proces waardoor bloed, dat in contact komt met andere oppervlakten dan de intacte wand van het bloedvat, gaat klonteren en vast wordt zodat een stolsel ontstaat. Verder heeft het ook de taak dat wanneer er een bloedstolsel nodig is, dit stolsel niet te groot wordt en daarmee een bloedvat geheel zou kunnen afsluiten. Hemostase is daarmee een complex proces dat goed uitgebalanceerd moet zijn. Dit systeem kan uit balans raken door bijvoorbeeld ontsteking of ziekte. In dit proefschrift wordt beschreven hoe twee verschillende ziektebeelden gepaard gaande met ontsteking, perifere arterieel vaatlijden (PAV) en levercirrose, van invloed zijn op de bloedstolling. Het eerste deel van dit proefschrift beschrijft de effecten van PAV op verschillende stappen van de bloedstolling en evalueert of een 'hypercoagulabele toestand' (een toestand waarbij er sprake is van een verhoogde stolbaarheid) kan voorspellen of PAV-patiënten een verhoogd risico op atherotrombotische complicaties hebben. Deel twee van dit proefschrift heeft als doel de hemostase van patiënten met cirrose beter in kaart te brengen met behulp van nieuw ontwikkelde stollingstesten die een volledig beeld van de stolling kunnen geven.

Deel 1 Interactie tussen de beschadigde vaatwand en het stollingssysteem

Hoofdstuk 2 beschrijft de recente ontwikkelingen op het gebied van de interacties tussen hemostase, het vasculair endotheel en atherosclerose en de mogelijke gevolgen van deze interacties voor zowel arteriële als veneuze trombose. Verscheidene studies hebben aangetoond dat de verschillende etio-pathogene mechanismes verantwoordelijk voor het ontstaan van zowel veneuze als arteriële stolsels, vergelijkbaar zijn en voldoen aan de gekende elementen van de triade van Virchow (1. bestanddelen van het bloed 2. de vaatwand 3. de stroming van het bloed). Het sturende onderdeel tussen deze elementen blijkt het vasculaire endotheel. Zodra beschadiging van de vaatwand optreedt reageert het beschadigde endotheel met een protrombotische, procoagulante en pro-inflammatoire staat waardoor er een verhoogde permeabiliteit van de vaatwand is en er een toename is van de opname van inflammatoire cellen en stollingseiwitten die nodig zijn voor wondgenezing en weefselreparatie. Aangezien een andere functie van het bloedstollingssysteem het activeren van het immuunsysteem betreft, kan gesteld worden dat pathologische stollingsziektebeelden zoals het optreden van een trombo-embolie of Diffuse Intravasale Stolling (DIS) een 'uit de hand gelopen' immuunreactie is op beschadiging van de vaatwand. Tussen hemostase en beschadiging van de vaatwand door atherosclerose lijkt eveneens een verband te bestaan; experimentele data tonen aan dat trombine betrokken is bij zowel de vroege als de late fases van het

atherosclerotisch proces. Ook het optreden van een veneuze trombose en atherosclerose wordt sinds kort met elkaar geassocieerd. De precieze aard van deze associatie is nog niet opgehelderd, echter lijkt verband te houden met de zogenaamde “inflammatie-coagulatie interactie” waarbij door aanhoudende ontsteking van de vaatwand bij een (idiopathische) trombose het atherosclerotisch proces wordt verergerd.

Na beschadiging van de vaatwand is de eerste stap die plaatsvindt in het hemostatische proces de formatie van een zogenaamde ‘platelet-plug’; een afsluitende prop van bloedplaatjes. Om de reactiviteit van trombocyten te bestuderen in patiënten met PAV werd in **hoofdstuk 3**, in een case-control studie, volbloed van 40 PAV-patiënten vergeleken met het volbloed van 40 gezonde controles. De reactiviteit van de trombocyten werd onderzocht middels flowcytometrie en ook werd de trombusformatie geobjectiveerd onder verschillende stroomcondities met een hoge afschuifspanning (‘shear’) met behulp van de recentelijk in Maastricht gevalideerde ‘flow chamber’. Patiënten die met aspirine behandeld werden toonden ten opzichte van de gezonde controles een onveranderde trombocyten-activiteit wanneer er getriggerd werd met ADP. Zodra er echter getriggerd werd met glycoproteïne VI werd een iets toegenomen reactiviteit geobjectiveerd en na stimulatie met de PAR-1 trombine receptor werd juist een afgenomen plaatjesreactiviteit waargenomen. In de ‘flow-experimenten’ werden ten aanzien van trombusformatie geen verschillen geobjectiveerd tussen PAV-patiënten en gezonde controles. Zodra er *in vitro* aspirine werd toegevoegd was er een significante afname van de trombusformatie, zeker wanneer deze experimenten werden uitgevoerd op oppervlakten bekleed met collageen. Aan de hand van deze resultaten concludeerden wij dat in PAV-patiënten, ondanks het gebruik van aspirine, de trombocyten-activatie onvoldoende onderdrukt is waardoor er nog steeds een risico bestaat op (ongewenste) trombusformatie. Derhalve bestaat de noodzaak tot een effectievere antitrombotische behandeling in patiënten met PAV.

In **hoofdstuk 4** verschuift de focus van ons onderzoek van primaire hemostase naar secundaire hemostase en stolselafbraak. In PAV-patiënten (dezelfde populatie als beschreven in hoofdstuk 3) bleken significant verhoogde spiegels van von Willebrand Factor-antigeen (vWF), fibrinogeen en D-dimeer aantoonbaar te zijn. De markers van trombine generatie experimenten toonden geen verschillen tussen PAV-patiënten en gezonde controles. Met behulp van gemodificeerde ROTEM-analyses bleek er wel een snellere stolselvorming en een toegenomen stevigheid van deze stolsels bij PAV-patiënten in vergelijking met de bloedstolsels van gezonde controles. Ten aanzien van de afbraak van de stolsels werden geen verschillen waargenomen. De 40 PAV-patiënten werden verder opgedeeld in twee groepen; patiënten die het afgelopen jaar een atherotrombotische complicatie doorgemaakt hadden (n=20) en een groep patiënten

zonder complicatie (n=20, gepaard op basis van leeftijd en geslacht). Tussen deze groepen bleken geen verschillen tussen hematologische, hemostatische parameters noch in de plasma trombine generatie resultaten. In volbloed bleken de Endogene Trombine Potentieel-waarden (ETP) van de patiënten met een complicatie echter lager dan de ETP-waarden van de patiënten zonder complicatie. In de ROTEM-analyses werd geen verschil tussen beide groepen geobserveerd.

Op basis van deze resultaten concludeerden wij dat: 1. Ondanks dat er in PAV-patiënten *in vivo* sprake is van een toegenomen doorgemaakte trombinevorming (blijkend uit het verhoogde D-dimeer) blijkt het *in vitro* trombine generatie potentieel niet verhoogd. Dit komt waarschijnlijk door het *in vivo* verbruik van de stoffactoren waardoor verdere trombine-formatie *in vitro* afgenomen is. 2. Hoewel dat het *in vitro* trombine generatie potentieel in plasma dus vergelijkbaar is tussen PAV-patiënten en gezonde controles, blijkt de uiteindelijke stolselvorming in volbloed van patiënten wel toegenomen. We hypothetiseren dat dit komt door de verhoogde fibrinogeenspiegel die gerelateerd is aan de inflammatie bij atherosclerose.

Hoofdstuk 5 beschrijft een systematische review en meta-analyse ten aanzien de waarde van D-dimeer als marker voor cardiovasculaire en arteriële trombotische complicaties in patiënten met PAV. Tien studies werden getraceerd waarin de data van 2420 PAV-patiënten met gemiddeld 9,77 cardiovasculaire complicaties per 100-patiëntjaren werd beschreven. In verband met significante heterogeniteit bleek het uiteindelijk slechts mogelijk om vier studies in de meta-analyse te includeren. Pooling van deze vier studies toonde aan dat er een onafhankelijke associatie was tussen een verhoogde D-dimeer spiegel en een twee keer verhoogd risico op een cardiovasculaire complicatie op korte termijn (RR 2.30, 95% CI: 1.43-3.68). Een verhoogde D-dimeer waarde bleek een betere voorspeller van arteriële trombotische complicaties en cardiovasculaire mortaliteit op de korte termijn (<4 jaar) dan op de lange termijn (>4 jaar). Als pathofysiologische verklaring voor deze gevonden associatie hypothetiseerden wij dat dit het gevolg is van het feit dat D-dimeer deel uitmaakt van de zogenaamde “inflammatie-coagulatie-as”: zowel inflammatie als de bloedstolling spelen een duidelijke rol in de progressie van atherosclerose. Verscheidene studies hebben aangetoond dat een component van de atherosclerotische plaque fibrinedraden betreft. Het is voorts in de literatuur gesuggereerd dat ‘hoe groter het oppervlak van het atherosclerotisch vaatbed, en hoe meer fibrinedraden des te sneller de progressie van atherosclerose, met ook destabilisatie van de atherosclerotische plaque en dientengevolge waarschijnlijk dus cardiovasculaire events’. Aangezien D-dimeren het afbraakproduct van fibrinedraden zijn is het dus mogelijk dat toename van D-dimeer in het plasma een potentiële risico-voorspeller voor atherotrombotische complicaties is.

In **hoofdstuk 6** beschrijven we de resultaten van onze eigen prospectieve studie met betrekking tot de waarde van zowel D-dimeer, vWF, fibrinogeen en trombine generatie experimenten uitgevoerd met de CAT-assay in het voorspellen van cerebro- en cardiovasculaire complicaties en progressie van lokale ziekte in patiënten met PAV. Tussen 2009 en 2013 werden 301 patiënten met recent gediagnosticeerd PAV uit drie Zuid-Limburgse ziekenhuizen geïnccludeerd. Het merendeel van de patiënten had PAV Fontaine stadium IIa (58,1%) of Fontaine stadium IIb (33,6%). 280 van deze patiënten werden gedurende een gemiddelde van 319 dagen gevolgd in de tijd. Gedurende deze tijd bleek bij 37,1% van de patiënten sprake van duidelijke progressie van PAV terwijl 6,8% een cerebro- of cardiovasculaire complicatie doormaakte. De gemiddelde D-dimeer, fibrinogeen en vWF-waarden van het bloed afgenomen bij inclusie bleken binnen de bovenste limiet van het referentie interval (454 ng/ml, 3.6 g/l en 150%, resp.) net zoals de genormaliseerde piek van de trombine generatie meting (131,7%). In de univariate analyse bleek dat diabetes mellitus de enige risicofactor was die geassocieerd was met het optreden van een cerebro- of cardiovasculaire complicatie. Een fibrinogeen spiegel hoger dan 3.6 g/l bleef geassocieerd met een afgenomen risico op progressie van PAV (HR 0.61; 95% CI 0.39-0.95, $p=0.03$). De gekozen hemostase parameters toonden geen significante associaties met het optreden van een complicatie dan wel progressie van ziekte. In de multivariate analyse bleef de gevonden associatie onafhankelijk significant (diabetes: HR 5.37; (95% CI 1.79-16.11, $p=0.003$). Op basis van onze gevonden resultaten moeten we dus concluderen dat, behoudens fibrinogeen, geen van de gekozen hemostase parameters geassocieerd is met het optreden van atherotrombotische events en progressie van PAV gedurende de gekozen follow-up duur. Kennelijk speelt plasma hypercoagulabiliteit geen predominante rol in de etiologie van cardiovasculaire complicaties bij patiënten met recent gediagnosticeerde PAV.

Deel II Hemostase problemen veroorzaakt door leverziekten in hun eindstadium

Het tweede deel van dit proefschrift focust op de veranderingen in de bloedstolling die ontstaan wanneer de leverfunctie verstoord is door het optreden van cirrose. De lever synthetiseert niet alleen een groot deel van de stollingsfactoren echter neemt ook de klaring van de geactiveerde producten van de stolling voor rekening. De onderwerpen 'hemostase' en 'de lever' zijn op deze manier nauw met elkaar verbonden. Ondanks de vooruitgang op wetenschappelijk gebied betreffende de kennis over stollingsafwijkingen, die ontstaan bij het optreden van cirrose, blijken er geen goede hemostatische testen te bestaan die deze veranderingen nauwkeurig kunnen bepalen.

In **hoofdstuk 7** wordt een cross-sectionele studie beschreven waarin met een panel biomarkers de verschillende mechanismes van hemostase in kaart worden gebracht van patiënten met cirrose. Zowel de trombine genererende capaciteiten als de daadwerkelijke stolsel-opbouw en -afbraak worden van 73 cirrose-patiënten en 20

gezonde controles met verschillende testen in kaart gebracht en vergeleken. De klassieke stoltesten (aPTT, PT en INR) waren significant verlengd wanneer de ernst van de cirrose toenam, terwijl het merendeel van de hematologische en hemostatische parameters significant waren afgenomen (hemoglobine, trombocyten, fibrinogeen, antitrombine (AT), proteïne C en plasminogen, $p < 0,05$). De spiegels van D-dimeer en vWF-antigeen waren echter significant verhoogd in Child-Pugh C patiënten. Nieuwe bevindingen van deze studie waren de toegenomen factor VIIa-spiegels en een milde toename van het complex van factor IXa-AT. Er bleek geen toename van het factor Xa-AT complex. Een verklaring van deze toegenomen activiteit van de extrinsieke stolling middels factor VII en vervolgens het factor IXa-AT complex kan mogelijk worden gevonden in de toename van circulerende micropartikels met tissue factor zoals recent werd beschreven door Rautou et al. In samenhang met deze marker van een protrombotische status bleken ook de trombine generatie parameters verhoogd zodra de ernst van de cirrose toenam. Patiënten met cirrose bleken in staat evenveel, zo niet meer, trombine te kunnen genereren als de gezonde controles. Dit bleek ook het geval in de metingen uitgevoerd in de afwezigheid van trombomoduline. Deze laatste bevinding bleek nieuw ten opzichte van eerder uitgevoerd onderzoek en kan waarschijnlijk worden verklaard door een andere uitvoering van de CAT-assay. Ook de gemodificeerde ROTEM analyses in volbloed toonden nieuwe uitkomsten waarbij sprake was van een afgenomen snelheid van stolselvorming en een afgenomen stolselsterkte zodra de levercirrose ernstiger was. Er werden geen significante verschillen gevonden in stolselafbraak tussen patiënten onderling (op basis van de Child-Pugh score) en tussen patiënten en gezonde controles. Aan de hand van deze resultaten concludeerden wij dat patiënten met cirrose een procoagulant plasma milieu hebben, maar dat in hun volbloed juist sprake is van een afgenomen stolcapaciteit. Er zijn geen verschillen in weerstand tegen fibrinolyse naarmate de ernst van de cirrose toeneemt.

De hoeveelheid gevormd trombine is afhankelijk van twee processen; enerzijds de vorming van trombine door de omzetting van protrombine, anderzijds de klaring van trombine uit het plasma (trombine inactivatie). In **hoofdstuk 8** hebben wij gepoogd beide processen bij cirrose-patiënten in kaart te brengen door zogenaamd 'computational modelling'. Verder wilden we objectiveren wat de invloed van beide, individuele processen was op de trombine generatie curves van patiënten en gezonde controles. Bloed van dezelfde patiëntenpopulatie als in hoofdstuk 7 werd geanalyseerd evenals het bloed van 30 gezonde vrijwilligers. In dit bloed werden de functionele antitrombine, α_2M , protrombine en fibrinogeenspiegels gemeten; deze bleken significant verlaagd wanneer de ernst van de cirrose toenam. De α_2M -spiegel bleek echter significant verhoogd in patiënten met Child-Pugh A cirrose. Hierna werden ook de trombine generatie curves in de aan- en afwezigheid van trombomoduline gemeten. Vervolgens werd op basis van de gemeten antitrombine, α_2M en fibrinogeenspiegels de

trombine inactivatie berekend met behulp van een wiskundig model. Protrombine conversie curves toonden aan dat de hoeveelheid protrombine die omgezet wordt in patiënten met cirrose duidelijk is afgenomen naarmate de ernst van de cirrose toeneemt. Deze afname wordt meest waarschijnlijk veroorzaakt door een kleinere hoeveelheid door de lever gesynthetiseerde protrombine. De snelheid van de omzetting van protrombine naar trombine was echter hoger in patiënten met cirrose waardoor gesuggereerd kan worden dat óf de concentratie óf de activiteit van het protrombinase-complex is toegenomen. Onze experimenten lieten verder zien dat de inactivatie van trombine duidelijk was afgenomen bij verergering van de cirrose. Dit kan worden verklaard door de significant afgenomen hoeveelheid TAT-complexen aangezien het trombine- α_2 M complex vergelijkbaar was tussen patiënten met cirrose en gezonde controles. Op basis van de behaalde resultaten concludeerden wij dat ondanks dat in plasma van patiënten met cirrose minder trombine wordt gevormd, het trombine wel sneller gevormd wordt en minder snel wordt geïnactiveerd. In de CAT-assay ontstaat daardoor een 'hypercoagulabel beeld'. Verdere berekeningen toonden aan dat exogene aanpassing van de protrombine omzetting, ofwel door toevoeging van protrombine complex concentraat ofwel door antitrombine, zouden leiden tot een verlies van de stollingsbalans. Dit ondersteunt de eerdere hypothese dat het stollingssysteem van patiënten met cirrose in een wankel evenwicht verkeert. Aanpassingen hieraan zouden juist leiden tot het uit balans raken van dit systeem met als gevolg het optreden van nadelige klinische effecten.

In **hoofdstuk 9** worden de resultaten besproken van een prospectieve studie waarbij zowel de klassieke hemostase parameters als de nieuwe "overall" stollings-assays gebruikt worden om de prognose van patiënten met cirrose te beoordelen. De al eerder beschreven 73 patiënten werden gevolgd in de tijd, met een gemiddelde van 29 maanden, en het samengestelde eindpunt bestaande uit majeure bloeding, trombose in een willekeurig bloedvat en leverziekte gerelateerde mortaliteit werd geclassificeerd als complicatie. De multivariate analyse toonde aan dat enkel het vWF-antigeen en D-dimeer significante voorspellers waren van complicaties. De trombine generatie assay en de gemodificeerde ROTEM-assay hebben geen aanvullende waarde voor deze risico inschatting. Er zijn verschillende verklaringen voor het toegenomen vWF-antigeen in patiënten met cirrose: 1. Een toegenomen secretie door het endotheel door beschadiging veroorzaakt door bacteriële endotoxines, 2. Portosystemische collateraalvorming en angiogenese waardoor er een groter endotheel-oppervlakte is en dus meer vWF-secretie, 3. Een afgenomen klaring van vWF door een vermindering van de door de lever gesynthetiseerde ADAMTS13.

Naarmate de ernst van de cirrose en portale hypertensie toeneemt zal de vWF-spiegel dus toenemen en daardoor betrouwbare informatie geven over een op hand zijnde (de-) compensatie van de patiënt. De reden dat D-dimeer onafhankelijk geassocieerd is met het optreden van een trombose- dan wel bloedingscomplicatie komt doordat D-

dimeer zowel informatie over zowel stolselopbouw als stolselafbraak geeft, verder worden D-dimeren geklaard door de lever en de D-dimeerspiegel geeft daarmee ook informatie over de klaringscapaciteit van de lever. De “overall” trombine generatie- en ROTEM-assays die gebruikt werden in onze studie geven geen informatie over de daadwerkelijke hoeveelheid fibrine die gevormd is, maar informeren ons over de mogelijkheid dat het bloed nog kan stollen of lyseren (het potentieel). Dat deze overall testen geen voorspellende waarde bleken te hebben in dit cohort geeft daarom aan dat het stollings- en fibrinolyse*potentieel* op moment van bloedafname van weinig nut is voor het voorspellen bleedings-dan wel trombotische complicaties in patiënten met cirrose.

In **hoofdstuk 10** worden de resultaten van dit proefschrift besproken en bediscussieerd waarna aanbevelingen worden gedaan voor toekomstig onderzoek. Gebaseerd op onze data en de data van eerdere studies lijkt echter geen afzonderlijke hemostase marker in staat de complexiteit van PAV in kaart te brengen. Een zogenaamde “multi-marker aanpak” van reeds bestaande en nieuw te ontwikkelen biomarkers lijkt daarom vereist om patiënten te kunnen identificeren die risico lopen op cerebro- en cardiovasculaire complicaties en progressie van PAV. Uit het tweede deel van het proefschrift blijkt dat er bij patiënten met cirrose, ondanks dat zij lagere spiegels (inactieve) pro- en anticoagulante factoren hebben, er juist een overall procoagulant *plasma* milieu bestaat waardoor een snelle omzetting is van protrombine in trombine en een afname van de trombine inactivatie. Op basis van onze resultaten, waarbij we klassieke stollingstesten combineerden met nieuwe overall stollingstesten, moeten wij de hypothese van een gerebalanceerd stollingssysteem in patiënten met cirrose onderschrijven. Deze balans is echter fragiel en kan omslaan naar zowel de bleedings- als de trombose kant. Uit dit proefschrift blijkt eveneens dat de huidige overall stollingstesten geen voorspellende waarde hebben ten aanzien van trombotische- of bleedings-complicaties bij patiënten met cirrose. Het blijft daarom een uitdaging de ideale overall stoltest te ontwikkelen die de patiënten met een verhoogd risico op stollingsgerelateerde complicaties wel herkent. Deze test zou idealiter zowel de primaire, secundaire hemostase als de fibrinolyse in ogenschouw moeten nemen. Aangezien dit, op dit moment, echter nog onwaarschijnlijk is, is het daarom raadzaam in verdere prospectieve studies stoltesten te combineren: klassieke en nieuwe testen, plasma en volbloedtesten gecombineerd met point-of-care plaatjesfunctie testen. Voorts zou het tevens interessant zijn om vWF en/of D-dimeer, mogelijk zelfs als een vervanging van de INR, toe te voegen aan de Child-Pugh en de MELD-score om hun separate waarde in deze modellen voor risicobeoordeling vast te stellen.